



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**MICELÁRNÍ INTERAKCE V PODMÍNKÁCH FÁZOVĚ
SEPAROVANÉHO HYDROGELU**

MICELLAR INTERACTION IN CONDITIONS OF PHASE-SEPARATED HYDROGEL

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Aneta Lokajová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1047/2015
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Aneta Lokajová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Micelární interakce v podmínkách fázově separovaného hydrogelu

Zadání bakalářské práce:

1. Provést rešerši na téma interakce v membránových (micelárních, liposomálních) systémech a možnosti její detekce pomocí fluorescenční spektroskopie.
2. Na základě rešerše vybrat vhodnou metodu stanovení interakce mezi micelami, které tvoří fázově separovaný hydrogel na bázi CTAB a hyaluronanu sodného.
3. Laboratorně ověřit nebo vyvrátit mezimicelární interakci v gelu připraveného fázovou separací z 200 mM roztoku CTAB a 2% roztoku hyaluronanu v prostředí 0,15 M NaCl pomocí vhodné fluorescenční metody.
4. Shrnout výsledky pozorování.

Termín odevzdání bakalářské práce: 1.6.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Aneta Lokajová
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Práce je zaměřena na studium interakce biopolymeru hyaluronanu s kationaktivním tensidem cetyltrimethylamoniumbromidem (CTAB) pomocí vybrané fluorescenční metody. Hyaluronan je přírodní biopolymer, který je silně hydrofilní a ve vodě tvoří viskózní roztoky. V živých organismech se nachází převážně v kloubech, kůži, očním sklivci, hraje roli při rakovinném bujení. Jelikož je netoxický a biodegradabilní, využívá se v kosmetice a medicíně jako hydratační činidlo nebo nosič do cílové tkáně. Práce je zaměřena na intrakce s hydrofobním tensidem, ve snaze prokázat nebo vyvrátit vzájemné působení. Vybranou fluorescenční metodou byla zkoumána emisní spektra pyrenu, který byl použit jako fluorescenční sonda.

ABSTRACT

The work aims to study the interaction between hyaluronic acid and the surfactant cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB) with proper fluorescent method. Hyaluronan is the strong hydrophilic natur polymer which product viscose solutions with water. It can be found in the joints, skin, eyeball in the live organism. It takes places at cancer growth. It is highly used in cosmetics and medicine because it is nontoxic and biodegradable. It is used as a aqueous agent or the drug delivery. The work aims to study the interaction with the hydrophobic surfactant with attemption to show or disprove the mutual effect. The emission spectra of pyrene were observed by fluorescence method. The pyren was used as a fluorescent probe.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hyaluronan, tensidy, micely, lipozomy, cetyltrimethylamoniumbromid, pyren, fluorescenční spektrofotometrie.

KEY WORDS

Hyaluronan, surfactants, micelles, liposomes, cetyltrimethylammoniumbromide, pyrene, fluorescent spectrophotometry.

LOKAJOVÁ, A. *Micelární interakce v podmínkách fázově separovaného hydrogelu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 31s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě chci poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za odborné vedení, čas, trpělivost a ochotu. Velké poděkování patří také mému příteli, rodině a kamarádům za podporu během studia.

OBSAH

1	Úvod	4
2	Teoretická část	5
2.1	Kyselina hyaluronová	5
2.2	Povrchově aktivní látky	6
2.2.1	Anionaktivní tenzidy	7
2.2.2	Kationaktivní tenzidy	7
2.2.3	Amfoterní tenzidy	7
2.2.4	Neionogenní tenzidy	7
2.2.5	Micelární soustavy	8
2.3	Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	10
2.3.1	Lipozomy	10
2.4	Elektronové přechody	12
2.4.1	Deaktivací procesy	13
2.5	Fluorescenční sondy	16
2.5.1	Pyren	16
2.6	Fluorescenční spektroskopie	17
2.6.1	Fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET)	17
2.6.2	Časově rozlišená fluorescence v mikroskopii	17
2.6.3	Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)	17
3	současný stav problematiky	18
4	EXPERimentální část	20
4.1	Přístroje	20
4.2	Použité chemikálie	21
4.3	Zásobní roztoky	21
4.4	Fluorescenční měření	22
5	Výsledky a diskuze	23
6	závěr	27
7	Literatura	29

1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová je známa již více než 80 let, poprvé byla využita v medicíně v 50. letech 20. století. Jedná se o vysokomolekulární látku, která se vyskytuje spíše ve formě své sodné soli. Je silně hydrofilní a při smíchání s vodou vytváří velmi viskózní roztok. V organismu se nachází v kloubních chrupavkách, reguluje hydrataci tkání, umožňuje pohyblivost svalů a kloubů. Je netoxická a biodegradabilní, což ji předurčuje k použití v medicíně nebo kosmetice. Používá se při léčbě povrchových zranění, popálenin, aj. V posledních letech je zkoumána její využitelnost jako nosiče léčiv. V prostředí roztoku tenzidu se hyaluronan chová jako polyelektrolyt a dochází k tvorbě specifické formy roztoku – tzv. perlový náhrdelník. Této skutečnosti by se dalo využít při cílené distribuci léčiv s použitím hydrogelů.

Tenzidy jsou amfifilní molekuly, které vytvářejí specifické útvary – micely. V polárním prostředí se uhlovodíkové řetězce molekul shluknou a vytvoří hydrofobní jádro chráněné hydrofilním obalem. Vznikne (většinou) kulovitý útvar s dutinou potenciálně využitelnou pro distribuci léčiv nebo jiných látek. Mezi biologicky aktivní amfifilní molekuly se řadí například lipidy nebo bílkoviny. Při působení vhodnými metodami na vrstvu lipidů může dojít k vytvoření umělého membránového útvaru – lipozomu. Lipozomy jsou sférické útvary s membránou tvořenou lipidovou dvojvrstvou. Existují monolamelární i multilamelární lipozomy. Stejně jako micely mají využití v klinické praxi při dopravování léčiv do cílové tkáně.

Pro studium chování systému byla zvolena metoda fluorescenční spektrofotometrie. Protože tenzidy samy o sobě nejsou fluorofory, byla použita fluorescenční sonda pyren. Jedná se o vysoce symetrickou molekulu se systémem konjugovaných dvojných vazeb. Jeho fluorescence je závislá na prostředí, čehož se využívá při studiu polaritě okolí pyrenu. Charakteristickým znakem je tvorba excimeru – excitovaného dimeru. Sleduje se hodnota intenzity fluorescence emisního spektra při 470 nm. Dále se vyhodnocuje hodnota emisního polaritního indexu, kdy se dávají do poměru hodnoty intenzit prvního a třetího píku emisního spektra.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

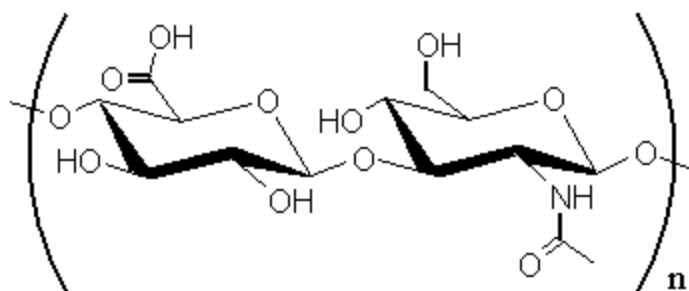
Kyselina hyaluronová byla poprvé izolována v roce 1934 dvojicí Karl Meyer a John Palmer. Izolace byla provedena ze sklivce oka skotu a výsledkem byla silně hygroskopická látka. Sůl této látky byla dobře rozpustná ve vodě a tvořila velmi viskózní roztoky. Jméno bylo odvozeno z řeckého hyalos (sklo) a jedné ze dvou monosacharidových jednotek, z nichž je molekula tvořena – uronové kyseliny. Zpočátku byla kyselina hyaluronová získávána z lidské pupeční šňůry a z kohoutích hřebínků. Dnes je nejčastěji vyráběna mikrobiální fermentací [29][1].

Kyselina hyaluronová je přirozeně se vyskytující vysokomolekulární lineární polysacharid tvořený dvěma opakujícími se podjednotkami, kyselinou D-glukuronovou a N-acetylglukosaminem. Vyskytuje se především ve formě sodné nebo jiné soli, proto se užívá spíše název hyaluronan. Při smíchání s vodou vzniká gelovitý roztok, vytvářením sítě z interagujících molekul nebo v rámci jedné molekuly. Tyto struktury mají jedinečné vlastnosti – dokážou odolat krátkodobému silovému proudu kapaliny a vykazují elastické vlastnosti. Pokud působí dlouhodobý proud, může dojít k oddělení molekul od sebe. Tím se uvolní jejich pohyb a začne se projevovat viskoelasticita. [1], [1]

Kyselina hyaluronová plní důležité funkce ve všech živých organismech. V lidském těle se vyskytuje ve formě sodné soli. Zvyšuje elasticitu očního sklivce, synoviální tekutiny v kloubech či reguluje hydrataci tkání. Je schopna vázat velké množství vody, čímž umožňuje pohyblivost svalů a kloubů. Množství hyaluronanu lze najít také v plicích, ledvinách, mozku, svalové tkáni a v kůži. Uplatňuje se při dělení buněk a při plastických operacích. Svou roli bohužel hraje také při vývoji nádorů, metastáz a při zánětech. Buňky rakovinného bujení mají zvýšenou afinitu k hyaluronanu, kterým se „obalí“ a stávají se tak pro imunitní systém neviditelnými. [1]

Díky svým vlastnostem (konzistence, biokompatibilita, netoxická) je využitelná v kosmetice i medicíně. V prvním zmíněném plní úlohu hydratační složky. V medicíně je využívána při léčbě pohybového ústrojí, v oftalmologii a při léčbě chirurgických ran. Ve veterinární medicíně se používá při léčbě zranění v ústní dutině a i při popáleninách. V posledních letech je hyaluronan studován jako možnost nosiče u cílené distribuce léčiv. Kvůli silné hydrofilnosti však nemůže vázat hydrofobní léčiva přímo. Proto se využívá roztoku tenzidů, ve kterém se využívá tvorby micelárních útvarů (viz dále). [3]

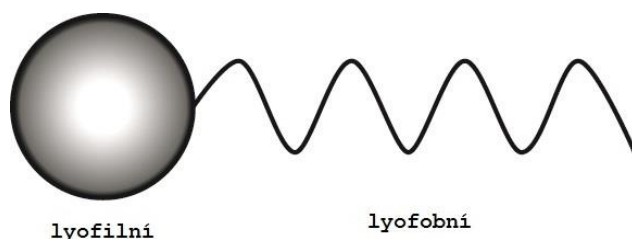
Díky své struktuře se dlouhé linie formují do sítí a vytváří v roztoku agregáty. Disacharidová jednotka je energeticky stabilizována výhodným sterickým uspořádáním - objemné skupiny jsou umístěny v ekvatoriální rovině, zatímco malé vodíky jsou v energeticky méně výhodné axiální rovině. Axiální vodíky tvoří nepolární, relativně hydrofobní část, zatímco ekvatoriální boční řetězce tvoří polární, hydrofilní část. V roztoku tenzidu se chová jako polyelektrolyt. [4]



Obrázek 1. Kyselina hyaluronová, převzato z [4]

2.2 Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky (PAL), nebo též tenzidy či surfaktanty, jsou organické látky ovlivňující povrchové napětí kapalin. Již při velmi malých přídavcích se koncentrují na rozhraní a vytváří adsorpční vrstvu. Toto charakteristické chování tenzidů je dáno jejich zvláštní molekulární strukturou. Molekula tenzidu se skládá ze dvou významných částí, viz Obrázek 2. Lyofilní hlava je silně afinitní k rozpouštědлу a zajišťuje tak dobrou rozpustnost. Lyofobní část naopak s rozpouštědlem téměř neinteraguje a zajišťuje tak tvorbu asociátů. Ve většině případů se setkáváme s vodným roztokem tenzidů, mluvíme tak o jejich hydrofilní a hydrofobní části. Takto složenou molekulu označujeme jako amfifilní nebo také amfipatickou [6].



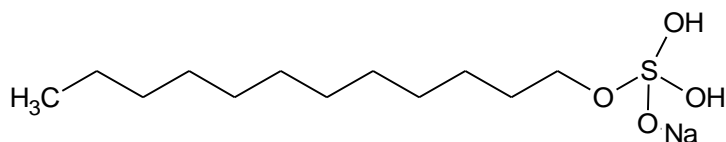
Obrázek 2. Molekula tenzidu

Adsorbováním na povrchu kapalin výrazně mění vlastnosti fázového rozhraní (snižují povrchové napětí) a ovlivňují procesy, které se odehrávají v těchto vrstvách. Známé je využití tenzidů jako detergenty, kdy dojde k hydrofilizaci povrchu, využívanou při vypírání tukových nečistot (mytí, praní), nanášení chemických postřiků na listy rostlin a krovky hmyzu, nebo o hydrofobizaci, využívanou při zpracování tkanin. Také se podílejí na regulaci stability různých disperzních soustav – mléko je stabilizováno povrchově aktivními molekulami albuminů, emulze kaučuku v mléčné šťávě kaučukovníků je stabilizována povrchově aktivními rostlinnými bílkoviny. Stabilizace disperzních soustav pomocí tenzidů se využívá při polymeraci latexu, při přípravě disperzí pesticidů, herbicidů, aj. [6]

Rozpustnost tenzidů ve vodě klesá s narůstající délkou uhlovodíkového řetězce. Podle schopnosti disociace se pak tyto látky dělí na ionogenní a neionogenní; ionogenní tenzidy se dále dělí na aniontové, kationtové a amfoterní. [6], [8]

2.2.1 Anionaktivní tenzidy

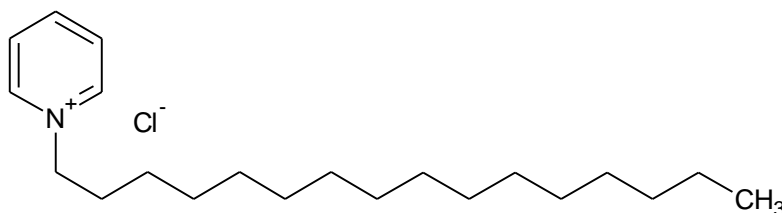
Anionaktivní tenzidy jsou sloučeniny, které při disociaci ve vodě vytvářejí povrchově aktivní anionty. Využívají se jako smáčedla, emulgátory, pěnidla a základní složka detergentů. Mezi typické zástupce patří alkalické soli vyšších mastných kyselin (mýdla). Jde především o sodné, draselné a amonné soli, které jsou díky skupině COO^- rozpustné ve vodě, nerozpustný uhlovodíkový řetězec zase zapříčiňuje asociaci. Dalšími zástupci jsou soli aromatických sulfonových kyselin, soli esterů kyseliny sírové, thiofosfáty, fosfáty, a další. [6], [8]



Obrázek 3. Ukázka anionaktivního tenzidu: Dodecylsulfát sodný

2.2.2 Kationaktivní tenzidy

Při disociaci těchto látek ve vodě vzniká povrchově aktivní kation. Využívají se jako inhibitory koroze, flotační činidla, baktericidní, dezinfekční a fungicidní činidla. Soli pyridiniových zásad se používají jako fixátory při barvení textilu. Patří sem hlavně alifatické a aromatické aminy (primární, sekundární i terciární) a jejich soli, kvartérní amoniové zásady a další. [6], [8]



Obrázek 4. Ukázka kationaktivního tenzidu: cetylpyridiniumchlorid

2.2.3 Amfoterní tenzidy

Amfoterní či amfolytické tenzidy jsou sloučeniny, které v molekule obsahují jak kyselou (většinou karboxylovou), tak bazickou (obvykle aminoskupinu) skupinu. V závislosti na pH prostředí vykazují anionaktivní nebo kationaktivní chování. V rozmezí pH 4 – 9 se mohou chovat jako neionogenní tenzidy. [6], [8]

2.2.4 Neionogenní tenzidy

Neionogenní tenzidy jsou sloučeniny rozpustné v kyselém i bazickém prostředí. Využívají se v textilním průmyslu, při těžbě ropy, jako složky pracích prostředků nebo jako odpěňovače. Do této skupiny patří polyoxyethylované primární a sekundární alifatické alkoholy, polyethylenglykolové estery mastných kyselin, glyceridy, glykosidy, estery sacharosy aj. Poslední zmíněný zástupce se díky netoxicitě využívá v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. [6], [8]

2.2.5 Micelární soustavy

Povahou tenzidu (ionogenní, neionogenní) je určena také schopnost oddělovat nepolární uhlovodíkové jádro od vody a vytvářet micelární soustavy. Roli hraje také interakce s rozpouštědlem. Při velkých zředěních tvoří tenzidy pravé roztoky. S narůstající koncentrací se však začínají seskupovat do micel. Micely jsou koloidní částice tvořící asociáty. V polárním rozpouštědle se molekuly tenzidu uspořádají tak, že nepolární část (dlouhý uhlovodíkový řetězec) vytvoří hydrofobní jádro obalené hydrofilním obalem. Celý agregát je stabilizován hydrofobními interakcemi. K seskupení molekul dochází při překročení určité koncentrace, kterou nazýváme kritická micelární koncentrace (CMC). Jedná se o nejvyšší možnou koncentraci, při které se tenzid v roztoku ještě nachází v molekulové formě ($10^{-5} - 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a je specifická pro každý tenzid. Tvorba micel může ale probíhat pouze při teplotách vyšších než je Krafftův bod. Při nižších teplotách je rozpustnost tenzidů malá a nižší než je kritická micelární koncentrace. Pro mnohé kapalné neionogenní tenzidy Krafftův bod chybí; charakterističtější je bod zákalu. Je to teplotní mez, kdy je zesílený zákal spojován se zvětšováním rozměru micel. [6], [8]

Při překročení kritické micelární koncentrace se molekuly tenzidu začnou v polárním rozpouštědle shlukovat do kulových micel. Roste-li koncentrace tenzidu v roztoku, zvyšuje se koncentrace kulových micel a dochází ke změně tvaru. Kulové micely se mění na elipsoidní, válcové, poté tyčinkové, páskové a destičkové. V těchto micelách uhlovodíkové řetězce zaujímají více a více rovnoběžné uspořádání.

Konkrétní tvar micely závisí na tvaru molekul tenzidu, na jeho koncentraci a na teplotě. Pro předpověď tvaru micely se používá úložný faktor:

$$N_s = \frac{V}{A \cdot l}, \quad (1)$$

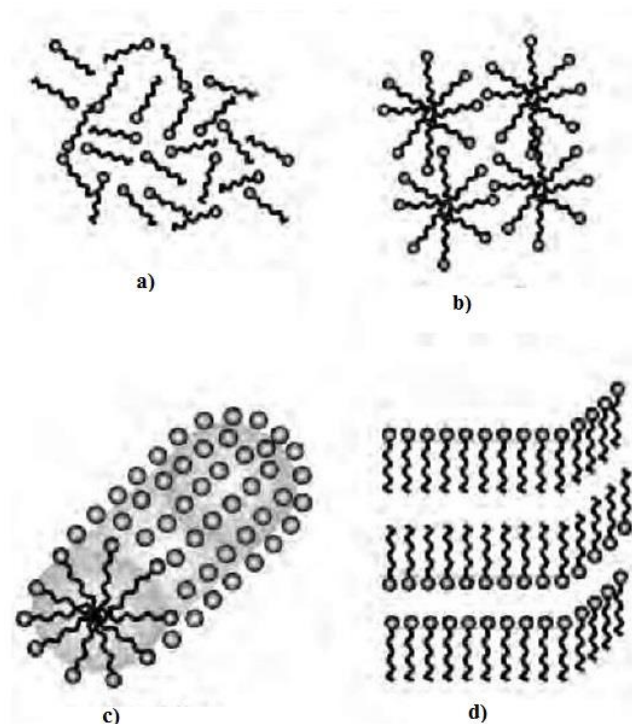
kde V je objem hydrofobní části molekuly, A je plocha na povrchu micely, kterou zabírá hydrofilní skupina a l je délka hydrofobního řetězce. [10]

V níže uvedené tabulce je uvedena závislost tvaru micel na hodnotě úložného faktoru.

Tabulka 1. Závislost tvaru micel na hodnotě úložného faktoru [10]

Hodnota úložného faktoru	Tvar micely
< 0,33	Kulové micely
0,33 až 0,50	Válcové micely
0,50 až 1,00	Vesikly
1,00	Planární dvouvrstvé membrány
> 1	Obrácené micely a jiné tvary

V nepolárních roztocích vznikají obrácené micely. Polární skupiny (hydrofilní hlavičky) se shlukují dovnitř micely a uhlovodíkové řetězce vytváří ochranný obal. Tento typ micel vzniká u tenzidů nerozpustných ve vodě.



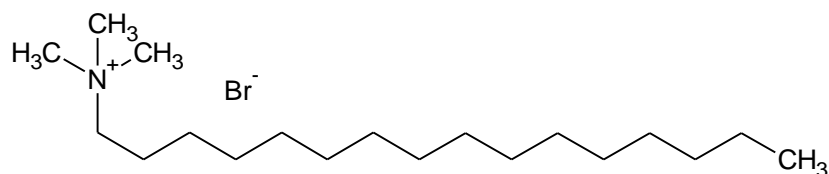
Obrázek 5. Ukázka tvaru micel: a) monomery tenzidu, b) "pravé micely", c) tyčinkovité micely, d) laminární micely, převzato a upraveno z [9]

Díky specifické struktuře jsou tenzidy využívány jako detergenty. V případě „pravých micel“ dochází k zachycení hydrofobní nečistoty dovnitř micely. Polární části molekul tenzidu interagují s rozpouštědlem a zajišťují tak rozpustnost jinak nerozpustné látky. Kromě detergentce může docházet k solubilizaci. Po přidání třetí složky do soustavy tenzid-rozpouštědlo dochází v závislosti na charakteru látky k potlačení nebo povzbuzení tvorby micel. Přídavek velkého množství organických polárních látek (nižší alkoholy) do vodného roztoku tenzidu usnadňuje rozpustnost tohoto tenzidu a tím dochází k potlačení tvorby micel. Po přidání malého množství těchto látek, případně nepolárních uhlovodíků nastává snížení kritické micelární koncentrace a tedy k usnadnění tvorby micel. Dochází ke změně struktury micely, třetí složka se stává její součástí. Díky tomu se např. v čisté vodě nerozpustné uhlovodíky rozpouští v micelárních roztocích tenzidů. V tomto případě se jedná o přímou solubilizaci (pohlčení uhlovodíku ve vodném roztoku); může nastávat také obrácená solubilizace (pohlčení vody v uhlovodíkovém prostředí). Solubilizační děj má značný význam při emulzní polymeraci nenasycených uhlovodíků při syntéze latexů (vodná disperze kaučuků). [6], [10]

2.3 Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

Kationaktivní tenzid CTAB rozpustný ve vodě se využívá jako antiseptický přípravek proti bakteriím a houbám, při izolaci DNA z tkání s vysokým obsahem polysacharidů či pro tvorbu pufrových roztoků. [6]

V roztoku tvoří spolu s hyaluronanem micelární útvary. Tento jev probíhá postupně s navyšováním koncentrace tenzidu. Při velmi nízké koncentraci tenzidu se v roztoku nachází jen jeho samostatné molekuly - monomery. Přídavkem tenzidu se na hladině roztoku vytváří monovrstva molekul tenzidu s hydrofilní částí zanořenou do roztoku a hydrofobní trčí ven. S pomalým nárůstem koncentrace se začnou vytvářet tzv. „minimicely“ a při dalším zkoncentrování se vytváří struktura „perlového náhrdelníku“ – „minimicely“ se rozmístí podél vláken polymeru, který funguje jako polyelektrolyt. S dosažením kritické micelární koncentrace se začínají tvořit pravé micely. Další přídavky tenzidu vedou k dalšímu vytváření micel v celém objemu roztoku. [6], [8], [10]



Obrázek 6. Strukturní vzorec molekuly CTAB [10]

2.3.1 Lipozomy

Mezi povrchově aktivní látky se také řadí některé biologicky aktivní látky – lipidy, bílkoviny, žlučové kyseliny. Molekuly těchto látek jsou rozděleny na dvě části – hydrofobní a hydrofilní, jedná se tedy také o amfipatické molekuly. [6]

Lipidy jsou estery glycerolu nebo sfingosinu a mastných kyselin s uhlovodíkovými řetězci o délce C₁₂ – C₁₈. Většina lipidů má dva nepolární řetězce, polární část je zastoupena esterovou skupinou nebo esterově vázanou kyselinou fosforečnou (fosfolipidy). V organismu jsou lipidy společně s bílkovinami hlavními složkami membrán. Díky převažujícím nepolárním uhlovodíkovým skupinám jsou obecně špatně rozpustné ve vodě. Na rozhraní olejovité a vodní fáze se orientují polárními částmi do vodné fáze a nepolárními do olejové. Vytvoří-li se z lipidů dvojvrstva, jedná se o základní strukturu biologických membrán. Když je ve vodném roztoku dosaženo kritické micelární koncentrace, začnou se tvořit micely. Pokud jsou do micel přimíchány žlučové kyseliny, vytvoří se smíšené micely s produkty trávení tuků. Tento proces usnadňuje vstřebávání lipidů v organismu. [13], [14]

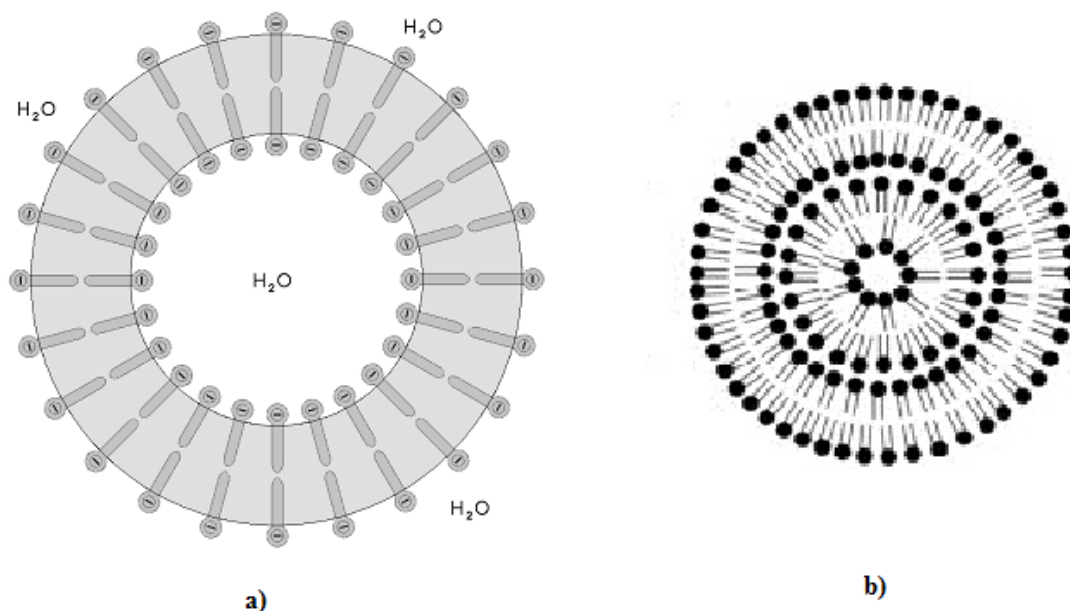
Ve vodném prostředí je možno z amfipatických lipidů vytvářet umělé membránové systémy – lipozomy. Jsou to kulovité vezikulární útvary, jejichž povrch je utvořen dvěma nebo více vrstvami lipidů, a uvnitř je uzavřena část vodného prostředí. Lze je získat např. působením ultrazvuku na suspenzi lipidů, metodou výměny rozpouštědla, odstraněním povrchově aktivních látek dialýzou smíšených micel nebo i třepáním vodné fáze v baňce se stěnami pokrytými vrstvou lipidů. Vytvářením lipozomů z vodného roztoku s komplikovaným složením může být doprovázeno zachycováním složek roztoku do těchto

částic. Povrchově aktivní látky rozpustné ve vodě (anorganické elektrolyty) a difilní molekuly povrchově aktivních látek (bílkoviny) jsou schopny se kromě zachycení uvnitř vezikulu také zabudovávat do dvojvrstev. Tento proces umožňuje koncentrování daných látek v lipozomech. [6], [13], [14]

V závislosti na podmínkách přípravy mají lipozomy různé rozměry a strukturu. Základní dělení lipozomů je na multilamelární a monolamelární, viz Obrázek 7. Multilamelární lipozomy mají membránu tvořenu více dvojvrstvami lipidů a průměr několik mikrometrů. Monolamelární lipozomy jsou tvořeny jedinou lipidovou dvojvrstvou a dále se dělí na mikrovezikuly (průměr částic 25 – 100 nm) a makrovezikuly (průměr částic 0,2 – 2 μm). [13], [14]

Struktura lipozomů umožňuje výměnné procesy buněk s vnějším prostředím. Díky tomu lze o těchto útvarech uvažovat v potenciálním klinickém využití, především v kombinaci s tkáňově specifickými protilátkami jako nosiče léků do cílové tkáně. Jedná se o cílenou distribuci léčiv, dopravení enzymů, DNA nebo jiných molekul do cílového orgánu, léčbu nádorových onemocnění. Lipozomy se používají pro přenos genů do cévních buněk a jako nosiče pro topické a transdermální podání léků a kosmetiky. [6], [13], [14]

Schopnost lipozomů v sobě zadržovat zachycenou látku při transportu v organismu je dána propustností membrán pro danou látku a také schopností membrán odolávat vlivům jiných látek v organismu (cholové kyseliny a její deriváty v zažívacím traktu). [6]



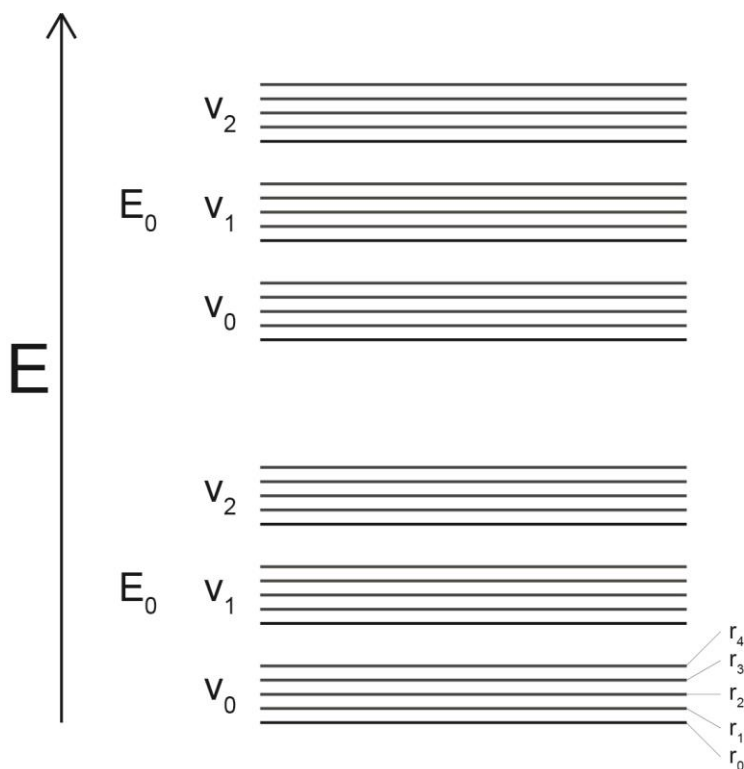
Obrázek 7. a) Monolamelární lipozom, b) multilamelární lipozom, převzato a upraveno z [15] a [16]

2.4 Elektronové přechody

Molekuly se za normálních podmínek běžně vyskytují v základním elektronovém stavu E_0 . Jejich energie je rovna součtu základní elektronové energie, vibrační energie a rotační energie:

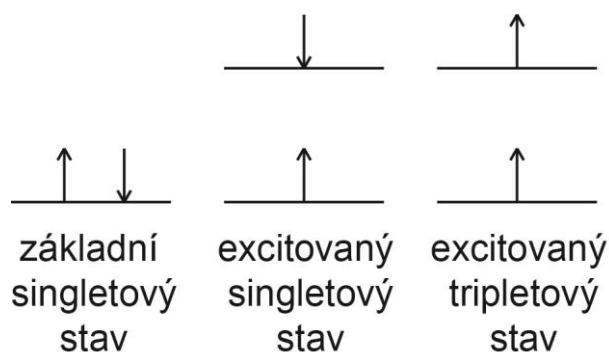
$$E_0 = E_e + E_v + E_r, \quad (2)$$

kde E_e je elektronová energie, E_v je vibrační energie a E_r je rotační energie. [8], [19]



Obrázek 8. Znázornění elektronových stavů

Elektronové stavy molekul mohou být singletové a tripletové. Při singletovém stavu tvoří elektrony v molekule páry s opačným spinem. Existuje také excitovaný singletový stav, ve kterém je jeden elektron v základní elektronové hladině a jeden v první excitované hladině. Spiny těchto elektronů jsou opačné. V tripletovém stavu se jeden elektron nachází v základním elektronovém stavu a jeden v excitované hladině. U těchto elektronů jsou spiny shodné. [8], [19]



Obrázek 9. Singletové a tripletový stav

Pohlcením fotonů z ultrafialového nebo viditelného spektra elektromagnetického záření molekula přechází do excitovaného stavu. Absorpční přechody látek mohou probíhat z různých vibračních a rotačních stavů základního elektronového stavu do vibračních a rotačních stavů jeho excitovaného stavu.

Absorbovaná energie se musí rovnat kvantu přijatého záření a rovná se rozdílu energie excitovaného stavu a základního elektronového stavu:

$$\Delta E = E_1 + E_0 = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r, \quad (3)$$

kde ΔE je absorbovaná energie, E_1 je energie excitovaného stavu, E_0 energie základního elektronového stavu, h je Planckova konstanta, rovna $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$, ν je frekvence záření, λ je vlnová délka záření a c je rychlost světla, rovna $2,99 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}$ [17].

Pravděpodobnost absorpce fotonu látkou je dána jejím molárním absorpčním koeficientem $\varepsilon [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$ definovaným pomocí Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c,$$

kde l [cm] je tloušťka vrstvy, c [M] je molární koncentrace.

V excitovaném stavu se však neudrží a zářivými i nezářivými přechody se snaží vrátit zpět na základní elektronovou hladinu. [8], [19]

2.4.1 Deaktivační procesy

Deaktivační procesy mohou být buď zářivé nebo nezářivé. Při zářivých procesech excitovaná látka emituje světelné záření, při nezářivých vyzařuje přebytečnou energii ve formě tepla. [8]

2.4.1.1 Nezářivé přechody

Základním nezářivým přechodem je vibrační relaxace. Po absorpci kvanta záření je elektron excitován na jednu z vyšších vibračních podhladin excitovaného stavu. Poté následuje rychlý přechod na nejnižší vibrační hladinu excitovaného stavu S_1 . Uvolní se

energie ve formě infračerveného záření. Princip se uplatňuje ve všech elektronových stavech, tedy i při přechodu z vyšších vibračních hladin stavu S_0 na základní. [18]

Pokud se vibrační podhladiny excitovaného stavu S_1 překrývají s vibračními podhladinami základního stavu S_0 , dochází k vnitřní konverzi. Energetická blízkost podhladin umožňuje elektronu přechod bez emise záření. Tímto způsobem se může elektron nezářivě vrátit z excitovaného stavu S_1 do základního stavu S_0 .

Nastane-li u jednoho elektronu změna spinu, dojde k mezisystémovému přechodu. Elektron přejde ze singletového stavu S_1 do tripletového T_1 s nižší energií. Při tomto ději nedochází k uvolnění energie, až později u následné vibrační relaxace. [18]

2.4.1.2 Zářivé přechody

Zářivými přechody rozumíme jakoukoliv formu luminiscence. Jako luminiscence se popisuje schopnost látek zářit po předchozím nabuzení. Může jít o buzení elektromagnetické, poté mluvíme o fotoluminiscenci, příkladem mohou být zářivky. Luminiscence může být vyvolána také elektrickým proudem (elektroluminiscence), chemickou reakcí (chemiluminiscence, příkladem je bioluminiscence u hlubokomořských živočichů), nebo zvýšenou teplotou (termoluminiscence). Emise záření nastává při návratu elektronu do základní elektronové hladiny z excitovaného stavu. [19].

Při mechanickém namáhání látky dochází k triboluminiscenci. Při mechanickém „roztržení“ molekuly dojde k nerovnoměrnému rozložení elektronů a vytvoření elektrických nábojů. Při cestě zpět do rovnováhy elektrony ionizují vzduch a lze pozorovat modrý záblesk. Nejznámějším příkladem je rozdrcení kostky cukru nebo rozlepení poštovní obálky.

V celé škále biologických systémů se vyskytuje bioluminiscence. Nejznámějšími zástupci tohoto typu luminiscence jsou světlušky, nicméně nejčastěji se vyskytuje u hlubokomořských živočichů jako reakce na prostředí s nedostatkem světla. Může také sloužit komunikačním, pářicím, sociálním nebo ochranným účelům. Bioluminiscence je způsobena biochemickými pochody mezi luciferiny, skupinou molekul emitující světlo, a enzymem luciferázou. Působením luciferázy dochází k oxidaci luciferinu, přebytečná energie se vyzáří ve formě světla. [19]

Dlouhotrvající emisní proces se nazývá fosforescence. Nejvýznamnější roli hraje přítomnost tripletového stavu. V bodě, kde se protínají křivky potenciálních energií singletového a tripletového stavu, mají tyto stavy stejnou energii. Díky mechanismu rozpárování elektronů ($\uparrow\downarrow$ do $\uparrow\uparrow$) dojde k mezisystémovému přechodu. V tripletovém stavu molekula vibrační relaxací pomalu odevzdává přebytečnou energii svému okolí. Nejníže však může dojít jen na nejnižší vibrační hladinu tripletového stavu. Vyzáření na základní singletový stav je spinově zakázáno. Dochází ale k zářivému přechodu, kdy molekuly emitují dlouho po původní excitaci. Nejlépe se fosforescence uplatňuje v pevných látkách, protože je v nich méně účinný přenos energie. [19]

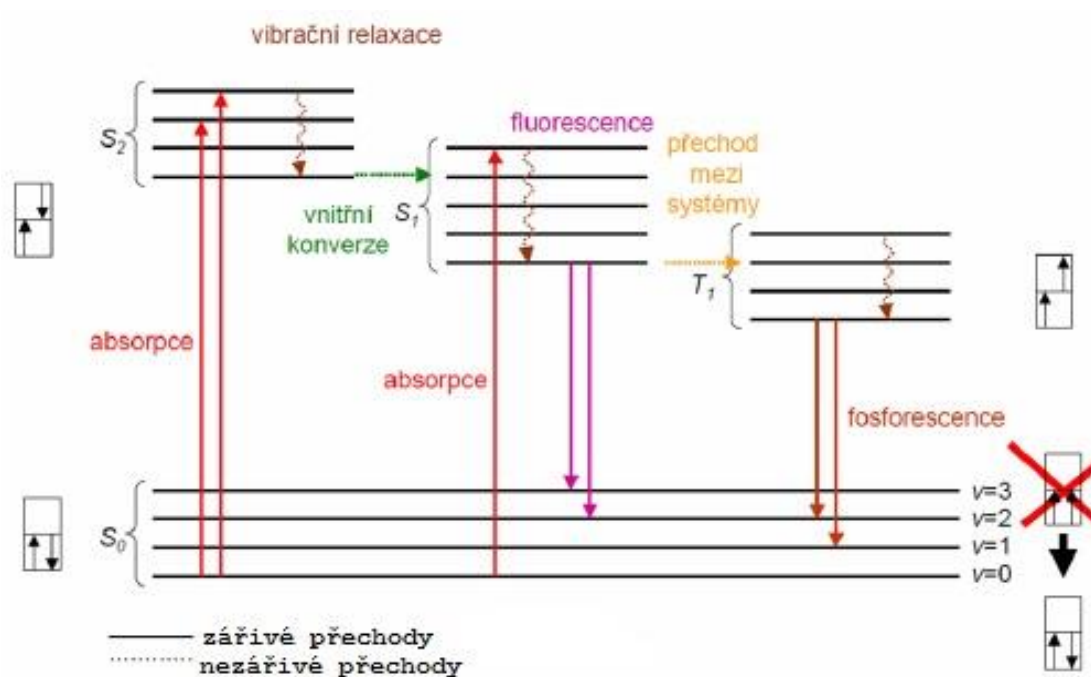
Typická emise např. pro aromatické uhlovodíky je fluorescence. Fluoreskovat mohou jen určité skupiny v molekule – fluorofory. [20]. Látka se navrácí z excitovaného stavu a při tom emituje záření s dobou života řádově okolo řádu desetin mikrosekund až jednotek nanosekund. Fluorescenčních vlastností se využívá u fluorescenčního měření ve spektrofotometrii. Výstupem záření je emisní spektrum, což je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce. Emisní spektrum je pro každou látku charakteristické a při UV-VIS spektrofotometrii se využívá pro identifikaci látek. Je charakterizováno píky při významných vlnových délkách. Srovnáme-li absorpční a emisní spektrum jedné látky, lze pozorovat rozdíly v maximech obou spekter. Tento jev se nazývá Stokesův posun. Je dán větší energetickým rozdílem nutným pro excitaci, než jaké množství energie je vyzářeno při emisi. Emisní spektrum je tak posunuto k vyšším vlnovým délkám. [8], [19]

Intenzitu fluorescence mohou snižovat vnitřní filtrační efekty. Vnitřní filtrační efekt I. druhu se uplatňuje spíše u koncentrovanějších roztoků. Dochází k absorpci excitačního záření svrchními vrstvami vzorku a vnitřní vrstvy jsou excitovány zářením o nižší intenzitě. Vnitřní filtrační efekt II. druhu vzniká reabsorpcí. Fluorofory jsou tím excitovány a emise záření probíhá do všech směrů. [8], [20]

U fluorescence se také může uplatňovat excimerová emise. V tomto případě tvoří molekuly fluoroforu komplexy s jinými molekulami téhož fluoroforu. Emisní pás je vzhledem k fluorescenci izolovaných molekul posunut k větším vlnovým délkám. Typickým zástupcem excimerové emise je pyren. Při nižších koncentracích převažuje fluorescence monomeru, se zvyšující se koncentrací však dochází k tvorbě excimeru. [19], [19]

Všechny druhy emisí mohou být potlačeny zhášením. Zhášení je zkrácení doby života excitovaného stavu kvůli přítomnosti jiných částic. Můžeme ho vyvolat záměrně (při přenosu energie nebo fotonů), nebo může jít o vedlejší reakci. Snižuje kvantový výtěžek reakce (poměr počtu fotonů emitovaných ku počtu fotonů absorbovaných). Ke zhášení může docházet kolizní deaktivací, přenosem rezonanční energie či přenosem elektronů. U srážkového mechanismu nastává kolize fluoroforu se zhášečem a následná deaktivace excitované molekuly. U statického zhášení vytváří fluorofor se zhášečem nefluoreskující komplex. Při vysokých koncentracích fluoroforu může nastat samozhášení. [20], [19]

Elektronové přechody, zářivé i nezářivé, se zobrazují do Jablonského diagramu, viz Obrázek 10.



Obrázek 10. Jabloňského diagram, převzato z [20]

2.5 Fluorescenční sondy

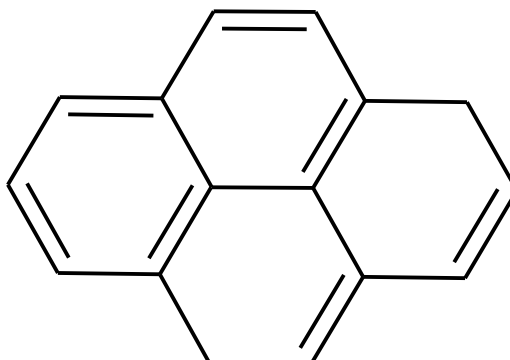
Fluorescenční sondy jsou většinou planární molekuly se systémem konjugovaných vazeb. Po absorpci ve viditelné ultrafialové oblasti spektra jsou schopny emitovat záření. Jsou velmi citlivé na změnu okolního prostředí. Přidávají se do roztoků látek, které nejsou samy schopny fluorescence. Jsou to vnější (nevlastní) fluorofory, které se nekovalentně vážou na zkoumanou látku. Tím jsou schopny ji detekovat. [21]

2.5.1 Pyren

Jako fluorescenční sonda byl zvolen pyren. Jde o polycyklický aromatický uhlovodík s vhodnými vlastnostmi. Jeho singletový první a druhý excitovaný stav nejsou moc daleko od sebe a tak dochází k velkému překryvu vibračních stavů. Je velmi symetrický, díky tomu jsou symetrické i excitované stavy. Fluorescence pyrenu je vysoce závislá na prostředí (na základním stavu molekuly). Čím je prostředí polaritnější, tím je pravděpodobnější přechod ze základního singletového do excitovaného stavu. [21]

Maximální absorpční spektrum pyrenu je při 335 nm, proto je tato hodnota používána jako excitační vlnová délka. Pro vyhodnocení fluorescence pyrenu se používá hodnota emisního polaritního indexu (EmPI) – měřítko polaritnosti prostředí. Jde o poměr intenzit prvního a třetího píku ($I_1/I_3 = 373/383$). Typickým znakem této sondy je tvorba excimeru – excitovaného dimeru, kdy jedna molekula pyrenu je v excitovaném stavu a druhá v základním. Excimer vzniká při vyšších koncentracích sondy v daném prostředí. Vyhodnocuje se poměr intenzit fluorescence emisního spektra při 470 nm a 373 nm (poměr Ex:Mo). Hodnota intenzity fluorescence excimeru závisí na počtu micel v systému. Při zvyšující se koncentraci tenzidu dochází k tvorbě micel, ve kterých se může pyren rozpouštět. Při malém počtu micel obsahuje

každá micela více než jednu molekulu pyrenu a lze pozorovat nárůst hodnot intenzity fluorescence excimeru. Dalším přidavkem tenzidu nad kritickou micelární koncentraci se zvyšuje počet micel a intenzita fluorescence excimeru klesá. [21]



Obrázek 11. Molekula pyrenu

2.6 Fluorescenční spektroskopie

2.6.1 Fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET)

Fluorescenční rezonanční přenos energie se používá k měření vzdálenosti v biologických systémech v rozsahu 1 – 9 nm. Proces spočívá v přenášení energie mezi fluorofory (donor a akceptor) navázanými do určitých míst biopolymeru nebo membrány. První fluorofor (donor) je excitován specifickou vlnovou délkou. Namísto fluorescenčního vyzáření je energie přenesena na druhý fluorofor (akceptor). Donory a akceptory mohou být někdy součástí systému – kofaktory, kyselé aminoskupiny [23]. Tato metoda je široce používána v biologii a biotechnologii na určení struktury, konformace a zjištění asociací mezi fluorescenčně označenými molekulami v rozmezí délek 1 – 10 nm. [23]

2.6.2 Časově rozlišená fluorescence v mikroskopii

Vzhledem k tomu, že intenzita fluorescence je ovlivněna mnoha faktory (pH prostředí, vlastnosti rozpouštědla, teplota, aj.), řešením může být měření intenzity v čase. Hodnoty vztažené k excitaci mohou poskytnout více doplňujících informací, např. o časově závislých nebo nezávislých procesech. Existuje řada experimentálních technik, kterými je možno rozlišit emisi v čase. Limitním faktorem této metody je počet fluorescenčních fotonů, které mohou být zobrazeny v jednom pixelu. Zobrazování pomocí časově rozlišené fluorescence se využívá bimolekulárních vědách, chemii nebo forenzních vědách. [23]

2.6.3 Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

Pomocí techniky FCS lze měřit i malé změny v roztocích látek, které se navenek projevují změnou difuzního koeficientu. Změny nastávají u mnoha biomolekul – především u bílkovin, RNA, DNA, když interagují s prostředím, vykonávají důležité biologické funkce (např. enzymatické katalýzy) nebo reagují na změny prostředí (pH, teplota). Schopnost přesně měřit difuzní koeficient je významná pro řadu aplikací, např. sledování konformačních změn v bílkovinách při navazování iontů nebo při rozbalování proteinů. [23]

3 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

V posledních letech je čím dál větší zájem o studium nosičových systémů. Dvouvrstvé vezikly se mohou uplatňovat jako cílené nosiče léčiv. Vznikají buď fragmentací lamelárních domén (proces top-down) nebo agregací z malých micel (proces bottom-up). Přičemž agregace z micel je méně častá, protože se jedná o nepreferovaný přechod – ze stabilní micely na dvouvrstvý vezikl [25].

Výzkum s lipozomy nabízí několik možných způsobů využití. Při vytvoření lipozomu lze do vnitřku inkorporovat sloučeninu, čímž lze využít lipozom k cílené distribuci do nádorů nebo tkání. Výsledky ukázaly, že DNA zachycená uvnitř lipozomů je méně náchylná k působení nukleáz, což lze využít ke genové terapii. Také lze obměňovat obsahu lipidů v membráně, což umožní systematický výzkum vlivu lipidového složení na určitou funkci membrány. Lze také měnit zastoupení jednotlivých mastných kyselin. Do membrány se dají dále inkorporovat purifikované membránové proteiny, případně inkorporace enzymů přímo do vezikulu. Výzkumy s purifikovanými proteiny (Ca^{2+} /ATP-asa) v některých případech ukazují, že k rekonstrukci iontové pumpy je třeba jen jediný protein a lipid. [8]

Častým objektem zkoumání jsou micelární agregáty v nanovelikostech. Zájem souvisí především s rozpustností v micelách a možnostmi jejich využití jako nanokontejnery a nanoreaktory. Kinetika agregace a relaxace je řízena dvěma soutěžními mechanismy – molekulárním (kdy dochází ke změně agregáční velikosti zachycením nebo vyvržením monomeru tenzidu) a kolizním. Kolizní mechanismus uvažuje fúzi dvou agregátů při kolizi nebo štěpní v závislosti na vnitřní nestabilitě. První mechanismus je dobře známý, k druhému chybí kinetická analýza a porovnání s prvním mechanismem. Bylo dokázáno, že fúze větších micel je limitována agregáčním číslem a celkovou koncentrací tenzidu. Zkoumání mechanismu bylo prováděno matematicky [26], [27].

Změny tvaru micel do různých tvarů a forem je široce využíváno na syntézu měkkých nanomateriálů. Průsvitné roztoky s tyčinkovými micelami se samy pod vlivem toku organizují a vytvářejí viskoelastické gely. Tokem organizovaná struktura je náplní mnoha studií i běžných zájmů, zejména ve snaze snížit náklady na linkovou výrobu aktivních nanomateriálů. Nevýhodou je fakt, že změna tvaru pod vlivem toku je reverzibilní a gel se rozpadá krátce poté, co se tok zastaví. Možným východiskem jsou mikrofluidní procesy s laminárním tokem, který umožňuje rychlou výrobu tokem indukovaného permanentního nanogelu. Zobrazování pomocí kryogenní transmisní elektronové mikroskopie těchto gelů ukázalo částečně provázanou micelární síť [28].

Při cílené distribuci léčiv se uplatňuje také kyselina hyaluronová. Vzhledem ke své biodegradabilitě a netoxicitě může být vpravena do organismu bez problémů. Díky své interakci s nádorovými buňkami, které k ní mají vyšší afinitu, je vhodným nosičem léčiv. Dále může být využita při hojení ran. Jedním z medicínských problémů je pomalé hojení kožních zranění. V průběhu hojení se může vlivem enzymové aktivity měnit pH, proto by vhodným materiálem byl biodegradabilní polymer [29], [4]. Ze stejného důvodu je

hyaluronan využíván při léčbě popálenin, zánětů a zranění v dutině ústní, zatím pouze ve veterinární medicíně.

Protože hyaluronan je vysoce hydrofilní molekula a (cytotoxická) léčiva bývají hydrofobní, použitím tenzidů se dosahuje lepší rozpustnosti. Využívá se vytváření micel, které ve svém jádru mohou nést hydrofobní látku i přes hydrofilní prostředí [30]. Pevnější spojení tvoří polyelektrolyty ve spojení s tenzidem s opačným nábojem [31]

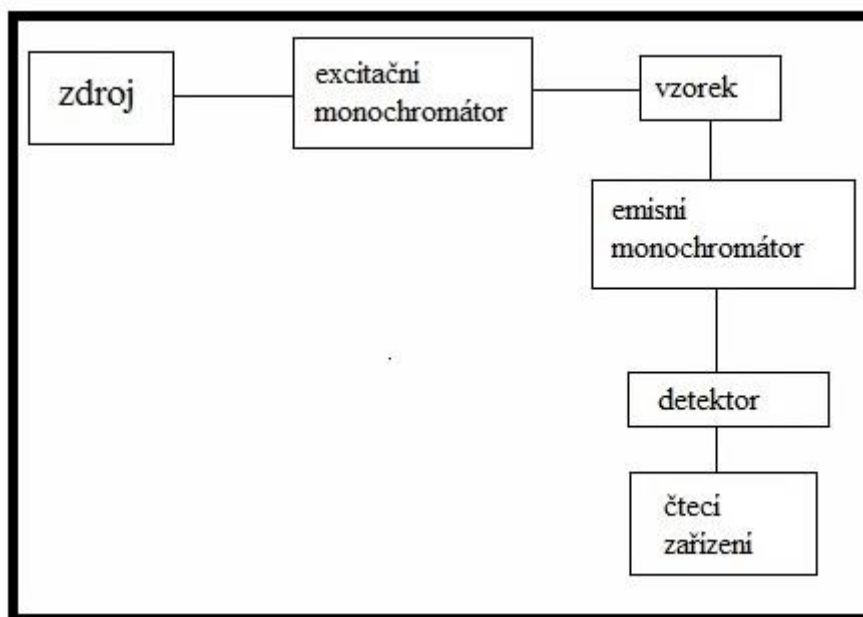
Distribuce léčiv může proběhnout i odlišným způsobem, pomocí niosomů, což jsou zvláštní druhy lipozomů. Jejich základem jsou neionogenní tenzidy. Na povrchu niosomů byla ukotvena esterifikovaná kyselina hyaluronová. Takto připravené niosomy vykazovaly dobrou elasticitu, schopnost deformace tvaru a lepší membránovou fluiditu. Díky tomu lépe pronikaly kůží. Proces byl sledován pomocí fluorescenční mikroskopie [32].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje

Pro měření fluorescenčních spekter byl použit luminiscenční spektrofotometr Aminco – Bowman Series 2 s xenonovou (150W) a zábleskovou (7W) lampou. Pro měření vzorků byla použita křemenná kyveta o optické dráze 1 cm, pro měření spekter gelů byla použita kyveta plastová. Teplota byla udržována pomocí termostatu na $25,0 \pm 0,1$ °C. Emisní spektrum pyrenu bylo měřeno v rozmezí od 350 nm do 550 nm, excitační vlnová délka byla nastavena na 335 nm. Krok měření byl zvolen 1 nm a citlivost měření byla nastavena na $5 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$.

Vizuální pozorování vzorků bylo prováděno pomocí ruční UV lampy Merci v laboratoři 2002.



Obrázek 12. Schéma luminiscenčního spektrofotometru Aminco

4.2 Použité chemikálie

Byl použit tenzid CTAB, hyaluronan (sodná sůl kyseliny hyaluronové), jako rozpouštědlo byl použit aceton, superčistá voda (MiliQ Milipore Academic) a roztok NaCl v superčisté vodě. Jako fluorescenční sonda byl použit pyren.

Tabulka 2. Použité chemikálie

CTAB (cetyltrimethylammoniumbromid) (tenzid)	$M_r = 364,45 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ CAS: 57-09-0
Hyaluronan (nativní) (polymer)	$M_r = 750 \text{ kDa}$ č. šarže 392-1202 6,717 % vlhkosti
NaCl	$M_r = 58,44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ CAS: 7647-14-5 č. šarže: PP/2009/06278
Pyren (fluorescenční sonda)	$M_r = 202,25 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ CAS: 129-00-0 č. šarže: 430166/1, 42304287 Fluka Sigma Aldrich
Aceton (rozpuštědlo)	$M_r = 58,08 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ CAS: 67-64-1 č. šarže: 1308200810
Voda MiliQ (rozpuštědlo)	Miliphore Academic, Purelab: ELGA

4.3 Zásobní roztoky

Byl připraven zásobní roztok NaCl, který dále sloužil jako rozpouštědlo pro přípravu zásobního roztoku tenzidu. Pevný NaCl byl rozpuštěn v Mili-Q vodě v takové navážce, aby výsledná koncentrace byla fyziologická (0,15 M).

Zásobní roztok CTAB byl připraven s koncentrací 200 mM. Pro lepší rozpuštění tenzidu byl roztok ponechán na magnetické míchačce.

Zásobní roztok hyaluronanu byl připraven s 2% koncentrací. Jako rozpouštědlo byla použita Mili-Q voda.

4.4 Fluorescenční měření

Vzhledem k tomu, že roztoky tenzidů samy o sobě nefluoreskují, bylo třeba k měřeným roztokům přidat fluorescenční sondu. Ve vialkách byl připraven acetonový odparek pyrenu v takovém množství, aby výsledná koncentrace sondy byla 10^{-3} M. Sonda byla poté zalita 10 ml zásobního roztoku CTAB a vzorek byl ponechán na magnetické míchačce. Tímto způsobem bylo připraveno 11 vzorků.

Dalších pět vzorků bylo připraveno smícháním 10 ml roztoku CTAB a přímým přisypáním potřebného množství pevného pyrenu. Vzorky byly průběžně promíchávány a byla sledována jejich fluorescence. Pozorování fluorescence bylo prováděno pouze vizuálně pomocí ruční UV lampy.

Ze sedmnácti vzorků CTAB s pyrenem bylo vybráno pět a smícháno se zásobním roztokem CTAB v poměrech 1:1, 1:5, 1:10, 1:50 a 1:100. U těchto roztoků byla opět pozorována fluorescence. Vizuální pozorování bylo prováděno stejným způsobem jako u nezředěných roztoků (viz Obrázek 13), spektrofotometrické měření bylo provedeno na spektrofotometru Aminco.

Z těchto pěti vzorků byly vytvořeny gely smícháním s 2% roztokem hyaluronanu. U gelů byla vizuálně prozkoumána fluorescence a poté byly změřeny na spektrofotometru. U každého vzorku byly zaznamenávány hodnoty intenzity fluorescence u prvního ($I_1 = 373$ nm) a třetího píku ($I_3 = 383$ nm) a hodnota fluorescence excimeru ($I_E = 470$ nm).



Obrázek 13. Vizuální pozorování, ukázka zásobního roztoku CTAB s pyrenovým excimerem

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

U všech vzorků byla průběžně vizuálně pozorována fluorescence a měřena emisní spektra. Fluorescenční sondy jsou hydrofobní látky a tedy jen velmi omezeně rozpustné ve vodě, intenzita fluorescence je tedy slabá. Dojde-li však k solubulizaci pyrenu v hydrofobním prostředí, intenzita fluorescence vzroste. Předpokladem tedy bylo, že při interakci hyaluronanu a hydrofobního tenzidu dojde k zvýšení intenzity.

Ukazatel polarity prostředí je poměr prvního a třetího píku. Bude-li polarita vzrůstat, bude se zvyšovat intenzita prvního píku, intenzita třetího píku však zůstane nezměněna. Dojde tedy ke zvýšení hodnoty emisního polaritního indexu.

Všechny hodnoty byly získány jako průměr vypočítaných hodnot ze tří měření.

U vzorku s největším zředěním dochází postupně k nárůstu hodnoty emisního polaritního indexu. Zvyšuje se polarita micelárního jádra, tím pádem by mělo se zvýšenou pravděpodobností docházet i k tvorbě excimeru. Hodnota intenzit Ex:Mo však v čase kolísá. Zdá se, jako by se vzniklý excimer rozpadl a časem se opět vytvořil, ale prozkoumáním intenzit fluorescence excimeru dojdeme k závěru, že tomu tak není. Pokles na velmi nízkou hodnotu signalizuje, že se v systému vytvořil velký počet micel, ve kterých se pyren může solubilizovat.

Tabulka 3. Hodnoty EmPI a Ex:Mo, vzorek s ředěním 1:100

1:100	první měření	druhé měření	třetí měření
EmPI	1,119 5	1,304 7	1, 327 9
Ex:Mo	0, 0384	0,022 7	0,0 679

Tabulka 4. Porovnání intenzity fluorescence významných píků u vzorku s ředěním 1:100

1:100	první měření	druhé měření	třetí měření
1. pík (373 nm)	14 860,5	9 589,68	1,200 3
3. pík (383 nm)	13 273,7	8 213,075	0,936 6
Excimer (470 nm)	569,911	272,149 4	0,083 9

Vzorek s ředěním 1:50 vykazoval následující hodnoty. Emisní polaritní index nejdříve narůstá, navzdory tomu, že klesá intenzita fluorescence excimeru i monomeru. Poté se opět zvýší na podobnou hodnotu jako při prvním měření. Hodnota excimeru nejdříve poklesne a poté vzroste téměř na dvojnásobek původní hodnoty. To by ukazovalo na vytvoření excimerů, ale intenzita excimeru v čase poklesla na nízkou hodnotu. Je však vyšší než v případě vzorku s ředěním 1:100.

Tabulka 5. Hodnoty EmPI a Ex:Mo, vzorek s ředěním 1:50

1:50	první měření	druhé měření	třetí měření
EmPI	1,131 7	1,353 7	1,118 2
Ex:Mo	0, 031 9	0,025 2	0,059 4

Tabulka 6. Porovnání intenzity fluorescence významných píků u vzorku s ředěním 1:50

1:50	první měření	druhé měření	třetí měření
1. pík (373 nm)	17 595,1	4 287,5	2,820 6
3. pík (383 nm)	15 548,25	3 192,665	2,601 2
Excimer (470 nm)	560,616 5	108,124	0,157 2

Hodnoty vzorku s ředěním 1:10. Hodnoty Ex:Mo mají podobný trend jako u vzorku s ředěním 1:50. Hodnota emisního polaritního indexu narůstá, to vede k závěru, že se zvyšuje polarita micelárního jádra. Mělo by tedy docházet k tvorbě excimerů, z hodnot intenzit fluorescence však lze usuzovat, že excimery se spíše rozpadají a pyren je solubilizován v micelách. Konečná intenzita excimeru je velmi podobná jako u vzorku s ředěním 1:100.

Tabulka 7. Hodnoty EmPI a Ex:Mo, vzorek s ředěním 1:10

1:10	první měření	druhé měření	třetí měření
EmPI	1,128 9	1,173 1	1,182 8
Ex:Mo	0, 042 7	0,036 5	0,051 9

Tabulka 8. Porovnání intenzity fluorescence významných píků u vzorku s ředěním 1:10

1:10	první měření	druhé měření	třetí měření
1. pík (373 nm)	14 221,35	3 124,475	1,092 2
3. pík (383 nm)	12 597,25	2 663,42	0,904 7
Excimer (470 nm)	608,126	114,102 5	0,072 6

U vzorku s ředěním 1:5 byly získány následující hodnoty. Emisní polaritní index po prvním měření vzrostl skoro na dvojnásobnou hodnotu, to by ukazovalo na tvorbu excimerů. Poměr Ex:Mo však po prvním měření klesá, stejně jako intenzita fluorescence excimeru. Stejně jako v předchozím případě to ukazuje na solubilizaci pyrenu ve vznikajících micelách.

Tabulka 9. Hodnoty EmPI a Ex:Mo, vzorek s ředěním 1:5

1:5	první měření	druhé měření	třetí měření
EmPI	0,590 3	1,255	1,118 7
Ex:Mo	0,081 1	0,056 5	0,075 3

Tabulka 10. Porovnání intenzity fluorescence významných píků u vzorku s ředěním 1:5

1:5	první měření	druhé měření	třetí měření
1. pík (373 nm)	3 864,39	2 759,869	1,653 4
3. pík (383 nm)	3 800,15	2 307,492	1,478 0
Excimer (470 nm)	314,229 5	102,715 9	0,124 5

Roztok s ředěním 1:1. Hodnoty z prvního měření se bohužel vinou technické chyby ztratily. Hodnota emisního polaritního indexu lehce vzrostla, to by opět ukazovalo na zvýšení polarit micelárního jádra a případnou tvorbu excimerů. Intenzita fluorescence při 470 nm však prudce klesá, se stejně rychlým spádem jako u všech ostatních vzorků. Navzdory tomu je tato hodnota intenzity excimeru nejvyšší ze všech měřených vzorků. Hodnota Ex:Mo lehce poklesla, stejně jako v předchozích případech nejspíš dochází k solubilizaci.

Tabulka 11. Hodnoty EmPI a Ex:Mo, vzorek s ředěním 1:1

1:1	první měření	druhé měření	třetí měření
EmPI	-	1,090 2	1,105 7
Ex:Mo	-	0,084 6	0,079 9

Tabulka 12. Porovnání intenzity fluorescence významných píků u vzorku s ředěním 1:5

1:1	první měření	druhé měření	třetí měření
1. pík (373 nm)	-	1 271,78	5,991 7
3. pík (383 nm)	-	1 166,5	5,419 6
Excimer (470 nm)	-	107,654	0,478 7

Byla proměřena i emisní spektra vytvořených gelů a vypočítány hodnoty emisního polaritního indexu a poměru Ex:Mo. Bohužel se ukázalo, že nebyla zvolena optimální metoda a hodnoty jsou tudíž značně zkreslené a zatížené chybou.

Tabulka 13. Hodnoty EmPI a Ex:Mo u připravených gelů

gely	EmPI	Ex:Mo
Gel č. 1 (ředění 1:1)	1,703 4	1,073 7
Gel č. 2 (ředění 1:5)	0,729 2	1,142 8
Gel č. 3 (ředění 1:10)	0,797 2	1,340 8
Gel č. 4 (ředění 1:50)	1,625 5	1,173 9
Gel č. 5 (ředění 1:100)	1,280 6	0,934 3

Tabulka 14. Hodnoty intenzit u významných píků u připravených gelů

gely	1. pík (373 nm)	3. pík (383 nm)	excimer (470 nm)
Gel č. 1 (ředění 1:1)	0,015 9	0,007 0	0,016 5
Gel č. 2 (ředění 1:5)	0,010 7	0,014 6	0,012 2
Gel č. 3 (ředění 1:10)	0,0112 9	0,0116	0,016 5
Gel č. 4 (ředění 1:50)	0,017 7	0,007 0	0,015 3
Gel č. 5 (ředění 1:100)	0,017 1	0,011 3	0,012 5

6 ZÁVĚR

Byla prozkoumána interakce mezi tenzidem CTAB a nativním hyaluronanem ve vodném roztoku. Zkoumání bylo provedeno pomocí fluorescenční spektrofotometrie.

Při prvním kroku, kdy byl zásobní roztok nasycen fluorescenční sondou, byly použity dva způsoby smíchání. Podle vizuálního pozorování nemá na dobu potřebnou k nasycení a na výsledné nasycení samotné vliv, zda byla sonda předrozpuštěna v acetonu či zda byla přidána do vzorku přímo v pevné formě.

Byla proměřena emisní spektra pyrenu v připravených roztocích. Ty byly připraveny ze zásobního roztoku CTAB nasyceného pyrenem a doplněném původním zásobním roztokem CTAB v poměrech 1:100, 1:50, 1:10, 1:5 a 1:1. Pozornost byla zaměřena na hodnoty intenzity fluorescence u prvního (373 nm) a třetího (383 nm) píku a na hodnotu při 470 nm. Z těchto hodnot intenzit byly vypočítány hodnoty emisního polaritního indexu (EmPI), který slouží jako ukazatel polaritního prostředí v okolí sondy (pyrenu), a hodnota Ex:Mo (poměr excimeru a monomeru = poměr intenzit při 470 nm a 373 nm). Tyto hodnoty byly vyhodnoceny společně s průměrnými hodnotami intenzit u daných vlnových délek.

Hodnota Ex:Mo vykazuje u všech vzorků stejné chování – z počáteční hodnoty klesne a poté opět vzroste. U vzorků s ředěním 1:100 a 1:50 vzrostl zhruba na dvojnásobek původní hodnoty, u vzorků s ředěním 1:10 a 1:5 vzrostl na přibližně stejnou hodnotu jako na počátku. K nárůstu hodnoty Ex:Mo dochází při zvýšení intenzity fluorescence excimerů. Dalo by se z těchto hodnot usuzovat, že se nejdříve vytvoří agregáty a poté dojde k tvorbě excimerů. Tuto domněnku by potvrzovaly i hodnoty emisních polaritních indexů, které při druhém měření narůstají. To by mohlo být způsobeno zvýšením polaritního jádra, při které pak s vyšší pravděpodobností dochází k tvorbě excimerů. Vzhledem k naměřeným hodnotám intenzit fluorescence u 470 nm však k tomuto jevu spíše nedochází. U všech vzorků dochází k výraznému snížení intenzity fluorescence.

V žádném vzorku nedochází ke zvyšování intenzity fluorescence, takže k interakci mezi hyaluronanem a tenzidem nejspíš nedochází. S největší pravděpodobností se v systému vytvoří větší množství micel, ve kterých se pyren solubilizuje a tím dochází k výrazným poklesům intenzity fluorescence.

U zpracování naměřených spekter gelů se ukázalo, že nebyla zvolena vhodná metoda. Do budoucna případně by bylo vhodnější tento typ systémů měřit jiným typem metody, např. přístrojem s vláknovým nástavcem, který v době našeho měření bohužel nebyl dostupný.

7 LITERATURA

- [1] NECAS, J., L BARTOSIKOVA, P BRAUNER a J KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*. 2008, 53(8), 397-411.
- [2] MEYER, Karl a John W. PALMER. The polysaccharide of the vitreous humor. *The Journal of the Biological Chemistry*. 1934, , 629 - 634. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/content/107/3/629.full.pdf>
- [3] Hyiodine. *Hyiodine* [online]. 2017 [cit. 2017-06-01]. Dostupné z: <https://www.hyiodine.cz/o-hyiodine>
- [4] Glycoforum. *Glycoforum* [online]. 1993 [cit. 2017-06-01]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [5] Hyaluronic acid. *Www.creativebiochem.com* [online]. 2011 [cit. 2016-01-10]. Dostupné z: http://www.creativepepworks.com/product_list.php?cid=16&pid=2&sid=91
- [6] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 3., přeprac. a rozš. Praha: VŠCHT, 1999. ISBN 80-7080-337-1.
- [7] ŠČUKIN, E. D., A. V. PERCOV a E. A. AMELINOVÁ. *Koloidní chemie*. Praha: Academia, 1990. ISBN 80-200-0259-6.
- [8] ATKINS, P. W. a Julio DE PAULA. *Fyzikální chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013. ISBN 978-80-7080-830-6.
- [9] Colloid Systems: Micelles, Nanocrystals, and Nanocrystal Superlattices (Nanotechnology). In: *What-when-how* [online]. [cit. 2017-06-01]. Dostupné z: <http://what-when-how.com/nanoscience-and-nanotechnology/colloid-systems-micelles-nanocrystals-and-nanocrystal-superlattices-nanotechnology/>
- [10] STRNADOVÁ, Hana a Libor KVÍTEK. Vliv pufru na tvorbu micel vybraných povrchově aktivních látek. In: *Chemické listy* [online]. Olomouc: Katedra fyzikální chemie, Univerzita Palackého v Olomouci, 2009 [cit. 2016-01-08]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_04_315-319.pdf.
- [11] CLARKE, J. D. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) DNA Miniprep for Plant DNA Isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009, **2009**(3), pdb.prot5177-pdb.prot5177. DOI: 10.1101/pdb.prot5177. ISSN 1559-6095. Dostupné také z: <http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.prot5177>

- [12] Cetyltrimethylammonium bromide. *ChemSpider* [online]. 2015 [cit. 2017-06-01]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5754.html>
- [13] MURRAY, Robert K. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha: Galén, c2012. ISBN 978-80-7262-907-7.
- [14] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H. Jinočany: H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.
- [15] KIM, Hyeongmin, Yeongseok KIM a Jaehwi LEE. Liposomal formulations for enhanced lymphatic drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, **8**(2), 96-103. DOI: 10.1016/j.ajps.2013.07.012. ISSN 18180876. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1818087613000135>
- [16] Lipozom. In: *Wikiwand* [online]. [cit. 2017-06-01]. Dostupné z: <http://www.wikiwand.com/ro/Lipozom>
- [17] ILATA, Viktor a Peter SEGĽA. *Spektrálne metódy v chémii*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 2004, 327 s. Edícia vysokoškolských učebníc. ISBN 80-227-2049-6.
- [18] GORE, Michael G. *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 2000. ISBN 01-996-3812-8.
- [19] TINOCO, Ignacio. *Physical chemistry: principles and applications in biological sciences*. 5th ed. Boston: Pearson, c2014. ISBN 03-218-9104-X.
- [20] HOFMANN, Andreas, Anne SIMON, Tanja GRKOVIC a Malcolm JONES. *Methods of Molecular Analysis in the Life Sciences*. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. ISBN 9781-1-107-04470-8.
- [21] DURSPEK, Jan. Fotoluminiscence - relaxace, emise. *Www.jandur.cz* [online]. [cit. 2016-01-10]. Dostupné z: <http://jandur.cz/fyz/luminiscence/lu3.htm>
- [22] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, c1999. ISBN 03-064-6093-9.
- [23] DURSPEK, Jan. Fluorescence, GFP protein. *Www.jandur.cz* [online]. [cit. 2016-01-10]. Dostupné z: <http://jandur.cz/fyz/luminiscence/lu4.htm>
- [24] *Fluorescence applications in biotechnology and life sciences*. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2009, xxvii, 367 s. ISBN 978-0-470-08370-3.

- [25] Study of the micelle-to-vesicle transition and smallest possible vesicle size by temperature-jumps. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013, (396), 173 - 177.
- [26] ZAKHAROV, Anatoly I., Loran Ts. ADZHEMYAN a Alexander K. SHCHEKIN. Relaxation times and modes of disturbed aggregate distribution in micellar solutions with fusion and fission of micelles. *The Journal of Chemical Physics*. 2015, **143**(12), 124902-. DOI: 10.1063/1.4931413. ISSN 0021-9606. Dostupné také z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4931413>
- [27] GRIFFITHS, I. M., C. J. W. BREWARD, D. M. COLEGATE, P. J. DELLAR, P. D. HOWELL a C. D. BAIN. A new pathway for the re-equilibration of micellar surfactant solutions. *Soft Matter*. 2013, **9**(3), 853-863. DOI: 10.1039/C2SM27154K. ISSN 1744-683x. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C2SM27154K>
- [28] VASUDEVAN, Mukund, Eric BUSE, Donglai LU, Hare KRISHNA, Ramki KALYANARAMAN, Amy Q. SHEN, Bamin KHOMAMI a Radhakrishna SURESHKUMAR. Irreversible nanogel formation in surfactant solutions by microporous flow. *Nature Materials*. 2010-3-21, **9**(5), 436-441. DOI: 10.1038/nmat2724. ISSN 1476-1122. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmat2724>
- [29] COWEN, Edward W, Glynis A SCOTT a Mary Gail MERCURIO. Self-healing juvenile cutaneous mucinosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2004, **50**(5), 97-100. DOI: 10.1016/j.jaad.2003.07.019. ISSN 01909622. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962203032882>
- [30] YIN, Dian-shu, Wan-yun YANG, Zhi-qiang GE a Ying-jin YUAN. A fluorescence study of sodium hyaluronate/surfactant interactions in aqueous media. *Carbohydrate Research*. 2005, **340**(6), 1201-1206. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.017. ISSN 00086215. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621505000479>
- [31] MONTEUX, Cécile, Marie-France LLAURO, Damien BAIGL, Claudine E. WILLIAMS, Olivier ANTHONY a Vance BERGERON. Interfacial Microgels Formed by Oppositely Charged Polyelectrolytes and Surfactants. 1. Influence of Polyelectrolyte Molecular Weight. *Langmuir*. 2004, **20**(13), 5358-5366. DOI: 10.1021/la0497853. ISSN 0743-7463. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la0497853>
- [32] KONGA, Ming, Chao FENG, Hyunjin PARK, Lin HOU, Xiaojie CHENG a Xiguan CHEN. Construction of hyaluronic acid noisome as functional transdermal nanocarrier for tumor therapy. *Carbohydrate Polymers*. 2013, (94), 634 641.